

555068

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年11月11日 (11.11.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/096275 A1(51) 国際特許分類: A61K 45/00, 35/74,  
47/32, 47/34, 47/38, 47/48, A61P 19/02, 29/00, 37/02,  
37/08, 35/00, 37/04, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005986

(22) 国際出願日: 2004年4月26日 (26.04.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-124340 2003年4月28日 (28.04.2003) JP  
特願2003-124345 2003年4月28日 (28.04.2003) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 積水化学工業株式会社 (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.)  
[JP/JP]; 〒5308565 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号 Osaka (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 新村 和夫 (SHIN-MURA, Kazuo) [JP/JP]; 〒6188589 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内 Osaka (JP). 北

原 慎一郎 (KITAHARA, Shinichiro) [JP/JP]; 〒6188589 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内 Osaka (JP). 阿部 佳子 (ABE, Yoshiko) [JP/JP]; 〒6188589 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内 Osaka (JP). 栗山 澄 (KURIYAMA, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒6188589 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 宮崎 主税, 外 (MIYAZAKI, Chikara et al.); 〒5400012 大阪府大阪市中央区谷町1丁目6番5号 西村ビル Osaka (JP).

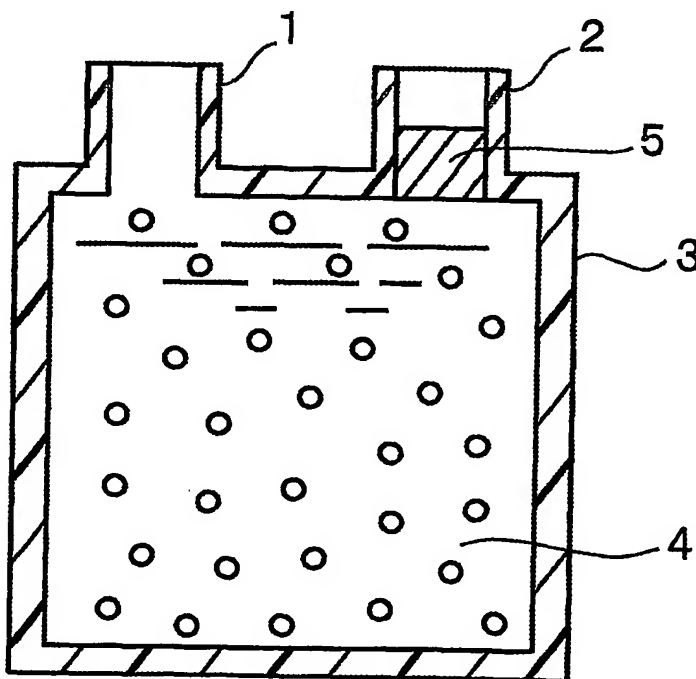
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,

[続葉有])

(54) Title: INSTRUMENT FOR INDUCING CYTOKINE AND METHOD OF INDUCING CYTOKINE

(54) 発明の名称: サイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法



(57) Abstract: It is intended to provide a novel instrument for inducing a cytokine and a method of inducing a cytokine by which a cytokine can be effectively induced compared to the existing cytokine induction therapy. Namely, an instrument for inducing a cytokine which contains a cytokine-inducing agent and a support made of a water-insoluble porous material; and a method of inducing a cytokine from cells producing the cytokine by using this instrument for inducing a cytokine.

(57) 要約: 従来のサイトカイン誘導方法に比べてより効果的にサイトカインを誘導することを可能とするサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法を提供する。サイトカイン誘導剤と、水に不溶性の多孔性の材料の担体とを含むサイトカイン誘導用具及び該サイトカイン誘導用具を用いたサイトカインを産生する細胞からサイトカインを誘導するサイトカイン誘導方法。

WO 2004/096275 A1



KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

## 明 細 書

## サイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法

## 5 技術分野

本発明は、サイトカイン誘導療法等に用いられ、効果的にサイトカインを誘導し得るサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法に関する。

## 10 背景技術

サイトカインは、多種多様な細胞間情報伝達因子の総称である。サイトカインとしては、例えば、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\gamma$ （IFN- $\gamma$ ）、インターロイキン1～インターロイキン27、腫瘍壊死因子- $\alpha$ （Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ ）、腫瘍壊死因子- $\beta$ （Tumor Necrosis Factor- $\beta$ ）、トランスフォーミング増殖因子- $\alpha$ （Transforming Growth Factor- $\alpha$ ）、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$ （Transforming Growth Factor- $\beta$ 、TGF- $\beta$ ）、及び、各種細胞増殖因子等  
15  
20  
25  
が挙げられる（臨床免疫第27巻特別増刊号1995年「サイトカインのすべて」科学評論社、臨床免疫第36巻、39-44、2001年、臨床免疫第39巻、189-200、2003年）。

サイトカインは生体内で様々な活性を有し、様々な疾患に関与していることが知られている。このようなサイトカインの活性を生体内で惹起  
25  
して疾患の治療を行う、サイトカイン誘導療法が従来より行われている。サイトカイン誘導療法では、患者に、サイトカイン誘導剤を投与し、生

体内においてサイトカインの誘導を引き起こす。このようなサイトカイン誘導療法に用いられるサイトカイン誘導物質として、様々な物質が知られている。例えば、微生物由来のOK-432、BCG、ベスタチン、丸山ワクチン、又は、ロムリチド等が知られており、担子菌類由来のサイトカイン誘導物質として、クレスチン、レンチナン、又は、シゾフィラン等が知られている。

例えば、OK-432やBCG等は血液等からインターロイキン1やインターフェロン $\gamma$ 等のサイトカインを誘導することが知られている（岐阜大医紀43：166-177、1995年、Molecular medicine Vol. 36、臨時増刊号、220-229、1999年）。

上述したサイトカイン誘導療法では、生体内でサイトカインを誘導することはできるが、充分量のサイトカインを誘導することが困難であり、強い効力を発揮させ難いという問題があった。また、サイトカインを効果的に誘導するために、サイトカイン誘導剤の投与量が多くなり、副作用が大きくなり、治療を有効に行い得ないという問題もあった。

特開昭61-277628号公報には溶連菌の一種であるOK-432を不溶性担体共有結合で結合してなる癌治療用白血球刺激材が記載されているが、これは腫瘍障害性細胞を誘導するものであり、この先行技術文献ではサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法については全く述べられていない。

一方、体外で体外循環システム等を用いて血液と不溶性材料等とを接触させる方法も検討されている。従来の体外循環システム等は血液中の有害物質の除去を目的とするものである。

また、輸血等に用いられている血液バッグなどは、血液または血液成分を貯蔵・保存のみを目的に用いられている。すなわち、積極的にサイ

トカインの産生を誘導するサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法は全く知られていないのが現状であった。

#### 発明の開示

- 5      本発明は、上記現状に鑑み、従来のサイトカイン誘導療法に比べてより効果的にサイトカインを誘導し得る新規なサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法を提供することを目的とする。

- 10      本発明は、サイトカイン誘導剤と、水に不溶性な多孔性の材料からなる担体とを含有するサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法である。なお、上記担体としては、サイトカイン誘導剤のサイトカイン誘導作用を増強する誘導増強剤であることが好ましい。更に、サイトカイン誘導作用を増強する誘導増強剤は I F N- $\gamma$  の誘導を増強することが好ましい。

- 15      本願発明者らは、サイトカイン誘導剤とともに水に不溶性の多孔性材料からなる担体を含むサイトカイン誘導用具、又は、サイトカイン誘導剤が固定化された不溶性担体からなるサイトカイン誘導用具が、著しく高いサイトカイン誘導量を示すことを見だし、本発明を完成した。

以下に本発明を詳述する。

- 20      本発明のサイトカイン誘導用具は、サイトカイン誘導剤と水に不溶性の多孔性材料からなる担体とを含有する。

上記担体としては、水に不溶性な多孔性の材料からなるものであれば特に限定されず、例えば、金属、有機物又は無機物等により構成され、好ましくは有機物材料、より好ましくは高分子材料からなる。

- 25      上記金属としては、例えば、金若しくは金合金、銀若しくは銀合金、チタン若しくはチタン合金、又は、ステンレス等が挙げられる。

上記無機物としては、例えば、活性炭、ガラス又はガラスの誘導体、

シリカ系組成物、アルミナ、ヒドロキシアパタイト等が挙げられる。

上記有機物材料又は高分子材料としては、例えば、セルロース系、ア  
ガロース系、デキストラン系、ポリスチレン系、アクリルエステル系、  
ポリエチレンテレフタレート系、ナイロン系、ポリビニルアルコール系、  
5 ポリスルホン系、ポリアミド系、ポリアクリロニトリル系、ポリエチレ  
ン系、ポリウレタン系、ポリプロピレン系、ポリエステル系等の材料が  
挙げられる。

上記ポリスチレン系の材料としては、例えば、ジビニルベンゼンス  
チレン共重合体等が挙げられ、アクリルエステル系の材料としては、例  
10 えば、ポリメチルメタクリレート、ポリヒドロキシエチルメタクリレ  
ート等が挙げられる。

上記担体としては、なかでも、ポリスチレン系、アクリルエステル系  
高分子材料からなるものが好ましい。

上記担体は無極性であり、疎水性であってもよく、この場合、担体と  
15 しては、ポリスチレン系高分子材料等を用いることができる。また、こ  
れらの担体には表面修飾や表面コーティング等により、表面に親水性を  
付与することもできる。

上記サイトカイン誘導剤の上記担体への固定化を物理吸着法によって  
行う場合には、上記担体としては、イオン交換性官能基や親水性官能基  
20 を有しない、疎水性の強い表面を有する材料からなることが好ましく、  
イオン交換性官能基や親水性官能基を有しない、スチレンからなる高分  
子材料からなることがより好ましく、スチレンにジビニルベンゼン等の  
架橋剤を用いた高分子材料からなることが特に好ましい。

上記担体の形状としては特に限定されず、例えば、繊維状、不織布状、  
25 スポンジ状、粒子状、膜状、中空糸状等の公知の形状を用いることがで  
きる。

上記担体の大きさとしては、粒子状では好ましい下限は $50\text{ }\mu\text{m}$ 、好ましい上限は $2\text{ mm}$ であり、繊維状では繊維径が $10\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることが好ましく、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることがより好ましい。

上記担体が繊維状である場合は不織布からなることが好ましく、繊維  
5 径は $3\text{ }\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。

さらに、特開昭61-277628号公報の癌治療用白血球刺激材では、白血球が吸着しない担体を用いることが好ましいと考えられるのに対して、本発明の上記担体は、白血球等を吸着する材料からなることが好ましく、白血球等を吸着する材料としては、例えば、ポリスチレン系、  
10 アクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、ポリビニルアルコール系、又は、酢酸セルロース等のセルロース系材料からなる高分子材料やガラス系の材料等が挙げられる。

上記担体としては、多孔性高分子材料からなるものが好ましい。

上記担体の形状としては、球状あるいは非球状の種々の形状のものを用いることができ、その形状は特に限定されない。なお、非球状としては、例えば、ペレット状、円柱状、円筒状、破碎状、繊維状、スポンジ状、中空糸状、シート状等が挙げられる。また、多孔性材料が容器内面や上記形状のものにコーティングなどによって付与されている材料でも良い。

20 上記多孔性高分子材料の表面積としては、 $400\text{ m}^2/\text{g}$ 以上であることが好ましく、細孔容積としては、 $0.5\text{ mL/g}$ であることが好ましく、平均細孔径としては、下限が $20\text{ }\text{\AA}$ 、上限が $800\text{ }\text{\AA}$ であることが好ましい。

上記多孔性高分子材料を大別すると標準的なゲル構造をもつゲル型と、  
25 巨大網目構造(Macro reticular structure)をもつMR型とに分けられる。また、単にスチレンとジビニルベンゼン

のような架橋剤を用いて重合して得られた多孔性樹脂等は透明に近く、ゲル構造を呈するのでゲル型多孔性樹脂と呼ばれる。一方、特殊な重合法によると物理的に多孔性の樹脂等を製造することができ、このような樹脂はMR型又はポーラス型多孔性樹脂と呼ばれる。更に、懸濁重合の際において水に不溶でモノマーだけを溶かすことのできる特殊な有機溶剤を使用することにより、粒子の内部奥にまで大きな孔（マクロポア）をもったMR型又はポーラス型の粒子を作製することができる。

粒子状の多孔性高分子材料としては、例えば、強酸性陽イオン交換樹脂、弱酸性陽イオン交換樹脂、強塩基性陰イオン交換樹脂、弱塩基性陰イオン交換樹脂、合成吸着剤の他、キレート樹脂等からなるものが挙げられる。これらの多孔性粒子は公知の方法によって得ることができ、例えば、原料モノマーをゼラチン等の適当な懸濁安定剤を用いて水中で懸濁重合することにより球状の重合体として製造される。上記原料モノマーとしては、スチレン、ビニルトルエン、アクリル酸エチル、メタクリル酸メチル、アクリロニトリル等のエチレン性二重結合を有する化合物が用いられ、これにジビニルベンゼン、エチレンジメタクリレート等の多官能性モノマーである架橋剤を加え、多孔化剤の存在下過酸化ベンゾイル、アゾビスイソブチルニトリル等の重合開始剤を用いて架橋重合体を得る。上記多孔性粒子のうち市販されているものとしては、例えば、三菱化学社製ダイヤイオン（登録商標）、ロームアンドハース社製アンバーライト等、ダウケミカル製ダウエックス等が挙げられる。

例えば、架橋結合をもった球状樹脂はスチレンとジビニルベンゼン（架橋剤）のモノマーを水に懸濁し、重合して作ることができるが、この時にモノマーを溶解するような適当な溶媒を加えると、重合の過程で相分離が誘発されて、その結果、下記の細孔分布測定法によって測定できる範囲の多孔度を有する高分子材料が作製される。



上記担体としては、巨大網目構造を有する多孔性高分子材料がより好ましい。上記巨大網目構造の細孔分布としては、下限が 2 Å、上限が 2000 Å であることが好ましく、より好ましい上限は 300 Å である。また、細孔分布は、一般に用いられている方法によって規定することができ、例えば、細孔容積の 5 ~ 95 % を占める細孔径で示すことができる。

細孔分布は従来より用いられている一般的な試験方法にて測定することができる。このような試験方法としては、例えば、水銀圧入法とガス吸着法そしてバブルポイント法等が挙げられる。水銀圧入法では、一般的に水銀圧入式ポロシメーターといわれている測定装置が用いられる。この原理は試料を真空処理できる容器に入れ、微細な孔に入っている水分や様々なガスを取り除く前処理をした後に、試料を水銀で覆うようにする。そして水銀全体に圧力を掛けていくと、水銀は逃げ場が無くなり、試料の表面にあいている微細な孔に入り出すことにある。圧力を上げれば上げるだけ、水銀は小さな孔に入っていくので、（つまり圧力と孔の大きさは反比例しているの）掛けた圧力と水銀の変化量を調べると、孔の大きさ（横軸）と孔の容積（縦軸）の関係のグラフ（細孔分布曲線）を得ることができる。

また、ガス吸着法では、一般的には窒素・ヘリウム・クリプトンなどのガスを用いて、先のポロシメーター同様、試料を真空装置で脱気させた後一定圧又は一定量のガスを試料容器に加えると、ガスの分子は試料の表面に吸着していく。水銀圧入法の場合は、大きな孔から水銀が入っていくが、ガス吸着法の場合は、小さな孔にガスが吸着されていくことから始まる。数十回に分けて試料にガスを加えていくと、吸着の飽和をそれぞれに繰り返す、それ以上与えても全く吸着しない状態になる。そして比較的小さな細孔までの細孔分布を計ることができる。

バブルポイント法は一般的には貫通した孔の細孔分布を計る方法で、フィルター・不織布などに適している。フロンの濡らした試料を固定し、窒素ガスを加圧していくと、ある圧力で大きな孔に着いていたフロンの液が飛ばされ泡となって飛んでいく。すると突然ガスはその孔から上に流れ出す。更にガスを多く試料に当てると再び1回目より高い圧力で、もう少し小さい孔よりフロンの液が泡となって飛びそこからガスが流れ出す。この時のガスの圧力と流れたガスの量を測るとポロシメーターと同様の細孔分布測定ができる。

10   なお、細孔分布の測定法は上記の方法に限定されず、細孔の分布が測定できる他の方法であっても良い。

上記サイトカイン誘導剤としては、例えば、BCG、BCG-CWS、PPD、Nocardia-CWS、OK-432、Muramyl dipeptide等の細菌類やその成分；PSK、レンチナン、シゾフィラン等の多糖類；ポリI：C、ポリA：U等のポリマー；Levamisole、DNCB、Azimexon、Tilorone、Bestatin等の化学物質が挙げられる。また、上記のような生理活性物質に限らず、菌体、菌体成分、抗酸菌、溶連菌、放線菌、ペプチド類、核酸類、蛋白質、糖成分、脂質、プロスタグランジン類、アラキドン酸代謝物類、Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)等の蛋白質の様々な物質もサイトカイン誘導剤として用いられ得る。

これらサイトカイン誘導剤の中でも、菌体及び／又はその菌体由来成分が好ましい。なかでも、抗酸菌と抗酸菌由来成分がより好ましく、結核菌や結核菌由来成分が特に好ましい。牛型結核菌弱毒株であるBCGとその由来成分も特に好ましい。

25      また、上記サイトカイン誘導剤としては、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分も好ましい。

また、上記サイトカイン誘導剤のみではサイトカイン誘導能を十分に発揮し得ないものであっても、上記担体と組み合わせて用いることにより、サイトカイン誘導活性を発揮させることもできる。従って、本発明におけるサイトカイン誘導剤としては、従来より用いられているサイトカイン誘導物質の他、様々な物質を用いることができる。

上記サイトカイン誘導剤を上記担体の表面に固定化するには、物理吸着、共有結合、イオン結合等の公知の方法を用いることができる。また、共有結合等による場合には、必要に応じて、上記サイトカイン誘導剤と上記担体との結合部に任意の長さをもつスペーサーを導入することが好ましい。

上記サイトカイン誘導剤が菌体等である場合は、必要に応じて、固定化する前に菌体の洗浄操作や破碎操作、成分分画操作等のさまざまな前処理を施してもよい。また、上記サイトカイン誘導剤が生菌等である場合は、より安全性を高めるために、必要に応じて、固定化する前、固定化と同時、固定化の後のいずれの時点でも、加熱処理・薬品処理・放射線処理・ガス滅菌処理等のさまざまな方法により死菌化してもよい。上記加熱処理としては、例えば、オートクレーブ処理が挙げられ、上記薬品処理としては、例えば、グルタルアルデヒド処理、ホルマリン処理、又は、エタノール処理が挙げられ、上記放射線処理としては、例えば、 $\gamma$ 線処理が挙げられ、上記ガス滅菌処理としては、例えば、エチレンオキサイドガス処理等が挙げられる。

上記サイトカイン誘導剤としては、蛋白質変性剤で変性されているものが好適に用いられる。上記蛋白質変性剤としては、例えば、グルタルアルデヒド、ホルマリン、エタノール等の各種溶剤や界面活性剤等が挙げられる。また、加熱処理等も蛋白質変性作用を発揮するので、水溶液中での加熱処理等も上記蛋白質変性剤に含まれる。なかでも、ホルマリ

ンにより変性されたサイトカイン誘導剤がより好ましい。

- 上記サイトカイン誘導剤がBCGのような微生物である場合は、菌体表面外壁成分のアミノ酸や糖成分等を介して、上記担体のカルボキシル基、アミノ基及び／又はエポキシ基等の官能基に結合させることができる。この際、必要に応じてさまざまな鎖長や構造のスペーサーを導入することもできる。

上記サイトカイン誘導剤がBCGのような菌体外層が脂質等により覆われている微生物である場合には、必要に応じて脂質を洗浄除去した後、上記担体の官能基に結合してもよい。

- 10 上記サイトカイン誘導剤を上記担体に固定化する方法としては、物理吸着法が好ましい。例えば、上記担体が疎水性表面を有し、上記サイトカイン誘導剤がBCGである場合、物理吸着作用によって固定化することができる。また、上記サイトカイン誘導剤が微生物やその成分であり、その表面が電荷を帯びている場合にも、その対極電荷を表面に有する担体
- 15 体に物理吸着作用によって固定化することができる。

上記担体の使用割合としては特に限定されないが、粒子状の担体として用いる場合には、血液容積に対する担体のかさ体積量として、下限は0.02%、上限は80%程度であり、好ましい下限は0.1%、好ましい上限は50%程度である。

- 20 上記サイトカイン誘導剤の使用割合としては特に限定されないが、例えば、BCGである場合は、血液に添加される濃度として、乾燥重量で下限は0.001mg/mL、上限は10mg/mLであることが好ましい。また、上記サイトカイン誘導剤がOK-432である場合は、血液に添加される濃度として、下限は0.0001KE/mL、上限は1
- 25 0KE/mLであることが好ましい。

容器内に収納された本発明のサイトカイン誘導用具を有するサイトカ

イン誘導用具もまた、本発明の 1 つである。

本発明のサイトカイン誘導用具では、上記担体とサイトカイン誘導剤とを含むサイトカイン誘導用具が、容器内にてサイトカインを産生する細胞と接触し、それによってサイトカインが効果的に誘導される。この  
5 場合、接触温度を下限は 15℃、上限は 42℃の範囲とすることが好ましく、それによって、サイトカインの誘導をより効果的に引き起こすことができる。

なお、上記担体、及び、上記サイトカイン誘導剤は、予め混合されてサイトカインを産生する細胞と接触されてもよく、又は、個別にサイト  
10 カインを産生する細胞と接触されてもよい。

また、本発明のサイトカイン誘導用具では、容器の構造は特に限定されないが、図 1 に模式的に示すように、血液等の導入部 1 と、サイトカイン誘導用具と接触した血液 4 等を容器外に導く導出部 2 とが備えられている容器 3 が好ましい。

15 上記容器としては、カラム状の容器や血液バッグ状の容器等がより好ましく、血液バッグ状の容器等がさらに好ましい。

また、血液バッグ状の容器等では、上記担体及び／又はサイトカイン誘導剤が容器内にて血液又は血液成分等と接触する時間を任意に選択できるので、必要なサイトカインを誘導することができる。

20 本発明のサイトカイン誘導用具は、上記担体及び／又はサイトカイン誘導剤と接触させた血液等を容器外に導く場合に、担体及び／又はサイトカイン誘導剤が血液等に混入しないように流出防止機構が備えられていることがより好ましい。

図 1 に模式的に示すように、担体及び／又はサイトカイン誘導剤流出  
25 防止機構 5 としては、上記担体が容器 3 内部に固定化されていることであってても良く、また、例えば、流出防止用の分離膜や分離フィルター等

が設けられていても良い。

本発明のサイトカイン誘導用具の1実施態様としては、例えば、導入部と導出部とを有する血液バッグに、粒子状、繊維状、不織布状等の担体5に固定化されたサイトカイン誘導剤を充填し、ここに血液又は血液成分等を導入する。その後、所定温度で所定時間インキュベートをし、サイトカインを誘導した血液又は血液成分等を導出部から取り出し、点滴等によるサイトカイン誘導療法等に利用することができる。

本発明のサイトカイン誘導用具を用いて実施するサイトカイン誘導方法もまた、本発明の1つである。

10 本発明のサイトカイン誘導用具又はサイトカイン誘導方法により誘導されるサイトカインとしては特に限定されないが、なかでも、インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、インターロイキン10 (IL-10)、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、が好適に挙げられる。例えば、IFN- $\gamma$ はアレルギー性疾患、癌等のさまざまな疾患において非常に重要な役割を担っているサイトカインであり、IFN- $\gamma$ を誘導することによりこれらの疾患に対する治療効果が期待できる。

本発明のサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法におけるサイトカインを産生することのできる細胞とは、血液、血液成分およびサイトカインを産生することのできるさまざまな細胞が挙げられ、血液から分離された白血球や血小板などに限らず、骨髄系細胞、樹状細胞、表皮細胞、繊維芽細胞、肝細胞、骨芽細胞、血液幹細胞、胚性幹細胞等の組織から採取した細胞や培養細胞、株化細胞、サイトカインを産生する様々な細胞等を含むものを指す。

25 本発明の本発明のサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法における血液とは血液や血液を適当な希釈液、例えば生理食塩水や培地、緩衝液等で希釈しているものを指す。血液に抗凝固剤や添加物を加えて

いても良い。

本発明のサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法における血液成分とは血液から分離された白血球や血小板などに限らず、骨髓系細胞、樹状細胞、血液幹細胞、血液細胞由来株化細胞等を含むものを  
5 指す。これらは単独で使用することもできるし、別途取りだした白血球等を血液等に混ぜ合わせて使用しても良い。また、適当な希釈液、例えば生理食塩水や培地、緩衝液等でこれらの細胞を希釈して本発明に用いても良いが、好ましくは血液を用いる。

なお、本文中の説明においては、説明を分かり易くするために、サイ  
10 トカインを産生する細胞として、血液または血液成分等を用いた例を取り上げて説明している。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明のサイトカイン誘導用具の一例を示す模式的断面図で  
15 ある。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

20 なお、ヒト血漿中の IFN- $\gamma$  の測定は、R & D S y s t e m s 社製 ELISA キット、ENDOGEN 社製 ELISA キット、又は日本抗体研究所製 ELISA キットにて行った。

#### (実施例 1)

担体 1 (オルガノ社製、商品名：アンバーライト XAD 4、多孔性ポリスチレン粒子、MR 型、細孔分布 2 ~ 150 Å、表面積 700 m<sup>2</sup>/g  
25 以上、細孔容積 0.5 mL/g 以上、平均細孔径約 120 Å) を精製水

(大塚製薬社製) にてデカンテーションにより洗浄し、しかる後メタノール(和光純薬社製、HPLC用) にてデカンテーションすることにより洗浄した。次に、注射用生理食塩水(大塚製薬社製) にて担体1をデカンテーションにより洗浄し、粒子かさ体積で50  $\mu$ Lの担体1を滅菌  
5 済みチューブ(ダイアヤترون社製、エッペンドルフチューブ1.5 mL用) に充填した。

健康人から採血し、ヘパリン15 IU/mL含有静脈血を得た。血液に1 mg/mLの濃度となるように、BCG(日本BCG製造社製) を添加した。なお、BCGは生理食塩水で調製した。この際、生理食塩水の体積が血液に対して1.25%となるようにした。  
10

上記BCGが添加された血液約1.45 mLを上記の担体1を充填したチューブに添加した。

次に、チューブを転倒混和して血液を攪拌し、ロータリーミキサー(TAITEC社製) に取り付け、6 rpmで転倒混和させつつ、37℃にて24時間恒温槽中でインキュベートした。インキュベート後の血液を  
15 4℃で3500 rpm(トミー精工社製、微量高速遠心機MRX-150) で15分間遠心し、しかる後血漿を採取し、-70℃で該血漿を凍結保存した。次に、保存された血漿を、融解し、Human IFN- $\gamma$  ELISAキット(R&D System社製又はENDOGEN社製) にて血漿中のIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。  
20

また、用いた健康人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後において、血漿中のIFN- $\gamma$ の値は全て10 pg/mL以下であった。

#### (比較例1)

25 担体1を用いなかったことと、BCGを添加した血液1.5 mLを用いたことを除いては、実施例1と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定し



た。結果を表 1 に示した。

(比較例 2)

担体 1 を用いなかったことと、BCG 無添加の血液を 1.5 mL を用いたことを除いては、実施例 1 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定し

5 た。結果を表 1 に示した。

(比較例 3)

BCG を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 1 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 1 に示した。

(実施例 2)

10 担体 1 を担体 2 (オルガノ社製、商品名：アンバーライト XAD 16 HP、ポリスチレン多孔性粒子、MR 型、細孔分布 2~300 Å、表面積 800 m<sup>2</sup>/g 以上、細孔容積 0.58~0.65 mL/g、平均細孔径約 150 Å) に変更したことを除いては実施例 1 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 1 に示した。

15 (比較例 4)

BCG を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 2 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 1 に示した。

(実施例 3)

20 担体 1 を担体 3 (オルガノ社製、商品名：アンバーライト XAD 2000、ポリスチレン多孔性粒子、MR 型、細孔分布 2~80 Å、表面積約 620 m<sup>2</sup>/g、細孔容積約 0.7 mL/g、平均細孔径約 40~50 Å) に変更したことを除いては実施例 1 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 1 に示した。

(比較例 5)

25 BCG を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 3 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 1 に示した。

## (実施例 4)

担体 1 を担体 4 (オルガノ社製、商品名：アンバーライト XAD 7 H P、アクリル酸系多孔性粒子、MR 型、細孔分布 2 ~ 2 0 0 0 Å、表面積 4 0 0 m<sup>2</sup>/g 以上、細孔容積 0. 5 mL/g 以上、平均細孔径約 4 0 0 ~ 5 0 0 Å) に変更したことを除いては実施例 1 と同様にして I F N - γ 誘導量を測定した。結果を表 1 に示した。

## (比較例 6)

B C G を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 4 と同様にして I F N - γ 誘導量を測定した。結果を表 1 に示した。

## 10 (比較例 7)

担体として P o l y s c i e n c e s 社製の商品名 P o l y b e a d s P o l y s t y r e n e M i c r o s p h e r e (粒子径 5 0 0 - 6 0 0 μ m、非多孔性) を用いたことを除いては、実施例 1 と同様にして I F N - γ 誘導量を測定した。結果を表 1 に示した。

## 15 (比較例 8)

担体としてモリテックス社製球状ポリスチレン粒子 (スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、粒子径 2 5 0 - 7 5 0 μ m、非多孔性) を用いたことを除いては、実施例 1 と同様にして I F N - γ 誘導量を測定した。結果を表 1 に示した。

## 20 (比較例 9)

担体としてモリテックス社製球状ポリメチルメタクリレート粒子 (粒子径 7 5 0 - 1 0 0 0 μ m、非多孔性) を用いたことを除いては、実施例 1 と同様にして I F N - γ 誘導量を測定した。結果を表 1 に示した。

## (比較例 1 0)

25 担体として P o l y s c i e n c e s 社製の商品名 P o l y b e a d s P o l y s t y r e n e M i c r o s p h e r e (粒子径 5 0 0

ー600 $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては、比較例3と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

(比較例11)

担体としてモリテックス社製球状ポリスチレン粒子(スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、粒子径250-750 $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては、比較例3と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

(比較例12)

担体としてモリテックス社製球状ポリメチルメタクリレート粒子(粒子径750-1000 $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては、比較例3と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

表 1

		IFN- $\gamma$ 濃度 (pg/mL)
実施例	1	231
	2	181
	3	186
	4	142
比較例	1	86
	2	<10
	3	<10
	4	<10
	5	<10
	6	<10
	7	78
	8	72
	9	77
	10	<10
	11	<10
	12	<10

## (実施例 5)

BCGに替えて、ピシバニール（中外製薬社製、OK-432）を、  
0.1KE/mLの濃度となるように各血液に添加した。なお、OK-  
432は、注射用生理食塩水（大塚製薬社製）で調製されたものであり、  
5 生理食塩水が血液に対して1%となるように調製した。OK-432が  
添加された血液を、担体1がかさ体積で20 $\mu$ L充填された上記チュー  
ブに、チューブの目盛りが1.5mLとなるように添加した。すなわち、  
血液を約1.48mL添加した。

その他は、実施例1と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結  
10 果を表2に示した。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培  
養した後において、血漿中のIFN- $\gamma$ の値は全て10pg/mL以下  
であった。

## (比較例 13)

15 担体1を用いなかったことと、及び、OK-432添加血液を1.5  
mL用いたことを除いては、実施例5と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を  
測定した。結果を表2に示した。

## (比較例 14)

担体1を用いなかったこと、及び、OK-432無添加の血液を1.  
20 5mL用いたことを除いては、実施例5と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量  
を測定した。結果を表2に示した。

## (比較例 15)

OK-432を血液に添加しなかったことを除いては、実施例5と同  
様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表2に示した。

## 25 (実施例 6)

担体1を担体2（オルガノ社製、商品名：アンバーライトXAD16

H P、ポリスチレン多孔性粒子、MR型、細孔分布2～300 Å、表面積800 m<sup>2</sup>/g以上、細孔容積0.58～0.65 mL/g、平均細孔径約150 Å)に変更したことを除いては実施例5と同様にしてI F N-γ誘導量を測定した。結果を表2に示した。

5 (比較例16)

OK-432を血液に添加しなかったことを除いては、実施例6と同様にしてI F N-γ誘導量を測定した。結果を表2に示した。

(実施例7)

担体1を担体3 (オルガノ社製、商品名：アンバーライトXAD2000、ポリスチレン多孔性粒子、MR型、細孔分布2～80 Å、表面積約620 m<sup>2</sup>/g、細孔容積約0.7 mL/g、平均細孔径約40～50 Å)に変更したことを除いては実施例5と同様にしてI F N-γ誘導量を測定した。結果を表2に示した。

(比較例17)

15 OK-432を血液に添加しなかったことを除いては、実施例7と同様にしてI F N-γ誘導量を測定した。結果を表2に示した。

(実施例8)

担体1を担体4 (オルガノ社製、商品名：アンバーライトXAD7HP、アクリル酸系多孔性粒子、MR型、細孔分布2～2000 Å、表面積400 m<sup>2</sup>/g以上、細孔容積0.5 mL/g以上、平均細孔径約400～500 Å)に変更したことを除いては実施例5と同様にしてI F N-γ誘導量を測定した。結果を表2に示した。

(比較例18)

25 OK-432を血液に添加しなかったことを除いては、実施例8と同様にしてI F N-γ誘導量を測定した。結果を表2に示した。

(比較例19)

担体としてPolysciences社製の商品名Polystyrene Microsphere（粒子径500-600 $\mu$ m、非多孔性）を用いたことを除いては、実施例5と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表2に示した。

5 （比較例20）

担体としてモリテックス社製球状ポリスチレン粒子（スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、粒子径250-750 $\mu$ m、非多孔性）を用いたことを除いては、実施例5と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表2に示した。

10 （比較例21）

担体としてモリテックス社製球状ポリメチルメタクリレート粒子（粒子径750-1000 $\mu$ m、非多孔性）を用いたことを除いては、実施例5と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表2に示した。

（比較例22）

15 担体としてPolysciences社製の商品名Polystyrene Microsphere（粒子径500-600 $\mu$ m、非多孔性）を用いたことを除いては、比較例15と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表2に示した。

（比較例23）

20 担体としてモリテックス社製球状ポリスチレン粒子（スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、粒子径250-750 $\mu$ m、非多孔性）を用いたことを除いては、比較例15と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表2に示した。

（比較例24）

25 担体としてモリテックス社製球状ポリメチルメタクリレート粒子（粒子径750-1000 $\mu$ m、非多孔性）を用いたことを除いては、比較

例 1 5 と同様にして I F N -  $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

表 2

		IFN- $\gamma$ 濃度 (pg/mL)
実施例	5	255
	6	236
	7	211
	8	192
比較例	13	107
	14	<10
	15	<10
	16	<10
	17	<10
	18	<10
	19	89
	20	86
	21	84
	22	<10
	23	<10
	24	<10

#### 5 (実施例 9)

担体 1 (オルガノ社製、アンバーライト XAD-4) かさ体積 1 mL と BCG (10 mg/mL) 1 mL とを生理食塩中で 37°C にて 20 時間混和し、BCG を担体 1 の粒子表面に物理吸着させた。混和後、担体 1 を生理食塩水にて充分洗浄し、再び生理食塩水に懸濁した。このよう  
 10 にして得られた、かさ体積 100  $\mu$ L 担体 1 を滅菌済みチューブに充填した。以下、このチューブに血液を 1.4 mL 添加したことを除いては実施例 1 と同様な操作を行い、健常人の血液により IFN- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後において、血漿中の IFN- $\gamma$  の値は全て 10 pg/mL 以下  
 15

であった。

(実施例 10)

担体 1 を担体 2 (オルガノ社製、アンバーライト XAD 16 HP) に替えた以外は実施例 9 と同様な操作を行い、健常人の血液により I F N- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

(実施例 11)

担体 1 を担体 3 (オルガノ社製、アンバーライト XAD 2000) に替えた以外は実施例 9 と同様な操作を行い、健常人の血液により I F N- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

10 (実施例 12)

担体 1 を担体 4 (オルガノ社製、アンバーライト XAD 7 HP) に替えた以外は実施例 9 と同様な操作を行い、健常人の血液により I F N- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

(比較例 25)

15 担体を用いなかったことと、BCG 添加血液を 1.5 mL を用いたことを除いては実施例 9 と同様に I F N- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

(比較例 26)

BCG を物理吸着していない担体を用いたことを除いては、実施例 9  
20 と同様に I F N- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

(比較例 27)

BCG を物理吸着していない担体を用いたことを除いては、実施例 10 と同様に I F N- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

(比較例 28)

25 BCG を物理吸着していない担体を用いたことを除いては、実施例 11 と同様に I F N- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。



(比較例 29)

BCGを物理吸着していない担体を用いたことを除いては、実施例 12と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表3に示した。

(比較例 30)

- 5 担体としてPolysciences社製商品名：Polybeads Polystyrene Microsphere (粒子径500-600  $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては実施例9と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表3に示した。

(比較例 31)

- 10 担体としてモリテックス社製球状ポリスチレン粒子 (スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、粒子径250-750  $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては実施例9と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表3に示した。

(比較例 32)

- 15 担体としてモリテックス社製球状ポリメチルメタクリレート粒子 (粒子径750-1000  $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては実施例9と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表3に示した。

(比較例 33)

- 20 BCGを物理吸着していない担体を用いたことを除いては、比較例30と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表3に示した。

(比較例 34)

BCGを物理吸着していない担体を用いたことを除いては、比較例31と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表3に示した。

(比較例 35)

- 25 BCGを物理吸着していない担体を用いたことを除いては、比較例32と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表3に示した。

表 3

		IFN- $\gamma$ 濃度 (pg/mL)
実施例	9	321
	10	283
	11	262
	12	126
比較例	25	84
	26	<10
	27	<10
	28	<10
	29	<10
	30	26
	31	22
	32	19
	33	<10
	34	<10
	35	<10

(実施例 13)

担体 1 かさ体積 1 mL と BCG (10 mg/mL) とを 1 mL の 1 容積%  
 5 ホルマリン液 (中性緩衝ホルマリン液、和光純薬工業社製) 含有生理食  
 塩中で 4℃ にて 20 時間混和し、BCG を粒子表面に物理吸着させた。  
 混和後、この粒子を生理食塩水にて充分洗浄した後、かさ体積で 100  
 $\mu$ L を滅菌済みチューブ (ダイアヤトロン社製、1.5 mL 用) に充填  
 した。

10 BCG のみの添加がないこと、及び、血液を 1.4 mL 添加したこと  
 を除いては実施例 1 と同様な操作を行い、IFN- $\gamma$  の誘導量を測定し  
 た。結果を表 11 に示した。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培  
 養した後において、血漿中の IFN- $\gamma$  の値は全て 10 pg/mL 以下  
 15 であった。

## (比較例 36)

B C G を物理吸着しなかったことを除いては、実施例 13 と同様に  
して I F N -  $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 4 に示した。

## (比較例 37)

- 5 担体 1 を用いなかったことと、B C G 添加 (1 m g / m L) 血液を 1 .  
5 m L 用いたことを除いては、実施例 13 と同様に I F N -  $\gamma$  の誘  
導量を測定した。

結果を表 4 に示した。

## (比較例 38)

- 10 担体として P o l y s c i e n c e s 社製商品名 : P o l y b e a d  
s P o l y s t y r e n e M i c r o s p h e r e (粒子径 500  
- 600  $\mu$  m、非多孔性) を用いたことを除いては実施例 13 と同様に  
して I F N -  $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 4 に示した。

## (比較例 39)

- 15 担体としてモリテックス社製球状ポリスチレン粒子 (スチレン-ジビ  
ニルベンゼン共重合体、粒子径 250 - 750  $\mu$  m、非多孔性) を用い  
たことを除いては実施例 13 と同様に I F N -  $\gamma$  誘導量を測定した。  
結果を表 4 に示した。

## (比較例 40)

- 20 担体としてモリテックス社製球状ポリメチルメタクリレート粒子 (粒  
子径 750 - 1000  $\mu$  m、非多孔性) を用いたことを除いては実施例  
13 と同様に I F N -  $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 4 に示した。

表 4

		IFN- $\gamma$ 濃度 (pg/mL)
実施例	13	256
比較例	36	<10
	37	102
	38	16
	39	14
	40	13

## (実施例 1 4)

実施例 1 3 と同様に作製した B C G を粒子表面に物理吸着させた担体  
 5 1 をかさ体積で 4 mL を血液バッグ（容量 5 0 mL 用）に充填した。健  
 常人から採血して得たヘパリン 1 5 I U / mL 含有の静脈血 5 0 mL を  
 この血液バッグに導入した。この血液バッグを 3 7 °C で 2 4 時間、穏や  
 かに攪拌しながらインキュベートした。この血液中の I F N -  $\gamma$  誘導量  
 を実施例 1 と同様に測定した。結果を表 5 に示した。また、用いた健常  
 10 人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後において、  
 血漿中の I F N -  $\gamma$  の値は全て 1 0 p g / mL 以下であった。

## (比較例 4 1)

B C G を物理吸着処理をしていない担体 1 を使用したこと以外は実施  
 例 1 4 と同様にして I F N -  $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 5 に示した。

## 15 (比較例 4 2)

担体 1 を用いなかったこと、及び、B C G の 1 m g / mL 添加血液 5  
 0 mL を用いたことを除いては、実施例 1 4 と同様にして I F N -  $\gamma$  誘  
 導量を測定した。結果を表 5 に示した。

## (比較例 4 3)

20 担体として P o l y s c i e n c e s 社製商品名 : P o l y b e a d  
 s P o l y s t y r e n e M i c r o s p h e r e （粒子径 5 0 0

ー 600  $\mu\text{m}$ 、非多孔性) を用いたことを除いては実施例 14 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 5 に示した。

(比較例 44)

担体としてモリテックス社製球状ポリスチレン粒子 (スチレンージビ  
5 ニルベンゼン共重合体、粒子径 250ー750  $\mu\text{m}$ 、非多孔性) を用いたことを除いては実施例 14 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 5 に示した。

(比較例 45)

担体としてモリテックス社製球状ポリメチルメタクリレート粒子 (粒  
10 子径 750ー1000  $\mu\text{m}$ 、非多孔性) を用いたことを除いては実施例 14 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 5 に示した。

表 5

		IFN- $\gamma$ 濃度 (pg/mL)
実施例	14	276
比較例	41	<10
	42	81
	43	26
	44	25
	45	22

15 (実施例 15)

BCG を生理食塩水に懸濁して、リン酸緩衝液にて希釈し、4000  
rpm にて 15 分間遠心操作を行った。上清を捨て、再びリン酸緩衝液  
にて懸濁し、4000 rpm にて 15 分間遠心操作を行った。これを 3  
回行い、次に 50% エタノール含有リン酸緩衝液にて懸濁し、4000  
20 rpm (トミー精工社製、微量高速遠心機 MRX-150) にて 15 分  
間遠心操作を行った。次にエタノールにて懸濁し、4000 rpm にて

1 5 分間遠心操作を行った。これを 2 回行い、再びリン酸緩衝液での洗  
浄を 3 回行った。この処理済み B C G 2 m g をカルボキシル基を導入し  
た担体 1 (かさ体積 1 m L) にカルボジイミド法にて共有結合を行った。  
残った反応基をエタノールアミンにて反応させ、リン酸緩衝液にて洗浄  
5 後、リン酸緩衝液に懸濁した。このようにして得られた担体 1 0 0  $\mu$  L  
を滅菌済みチューブに充填した。

B C G のみの添加がないこと、及び、血液添加量を 1 . 4 m L にした  
ことを除いては実施例 1 と同様な操作を行い、I F N -  $\gamma$  の誘導量を測  
定した。結果を表 6 に示した。

10 また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養  
した後に

において、血漿中の I F N -  $\gamma$  の値は全て 1 0 p g / m L 以下であった。

(比較例 4 6)

B C G を共有結合しなかったことを除いては、実施例 1 5 と同様な操  
15 作を行い、I F N -  $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 6 に示した。

(比較例 4 7)

担体 1 を用いなかったこと、及び、B C G の 1 m g / m L 添加血液 1 .  
5 m L を用いたことを除いては、実施例 1 5 と同様に I F N -  $\gamma$  誘  
導量を測定した。

20 結果を表 6 に示した。

(比較例 4 8)

担体として P o l y s c i e n c e s 社製商品名 : P o l y b e a d  
s P o l y s t y r e n e M i c r o s p h e r e (粒子径 5 0 0  
- 6 0 0  $\mu$  m、非多孔性) を用いたことを除いては実施例 1 5 と同様に  
25 して I F N -  $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 6 に示した。

表 6

		IFN- $\gamma$ 濃度 (pg/mL)
実施例	15	122
比較例	46	<10
	47	72
	48	11

## (実施例 16)

実施例 13 と同様に作製した BCG を粒子表面に物理吸着させた担体  
 5 1 をかさ体積で 0.8mL を血液バッグ（容量 5 mL 用）に充填した。健  
 常人から採血して得たヘパリン 15 IU/mL 含有の静脈血 5 mL をこ  
 の血液バッグに導入した。この血液バッグを 37℃ で 24 時間、穏やか  
 に攪拌しながらインキュベートした。この血液中の TNF- $\alpha$  誘導量を、  
 ENDOGEN 社製ヒト TNF- $\alpha$  測定キットを用いたこと以外実施例 1 と同  
 10 様に測定した。結果を表 7 に示した。また、用いた健常人の血液の採血  
 直後及び上記と同様に血液のみを培養した後において、血漿中の TNF-  
 $\alpha$  の値は全て 16 pg/mL 以下であった。

## (比較例 49)

BCG を物理吸着処理していない担体 1 を使用したこと以外は実施例  
 15 16 と同様にして TNF- $\alpha$  誘導量を測定した。結果を表 7 に示した。

表 7

	TNF- $\alpha$ (pg/mL)
実施例 16	2390
比較例 49	<156

## (実施例 17)

20 実施例 13 と同様に作製した BCG を粒子表面に物理吸着させた担体

1 をかさ体積で 0.8mL を血液バッグ（容量 5 mL 用）に充填した。健常人から採血して得たヘパリン 15 IU/mL 含有の静脈血 5 mL をこの血液バッグに導入した。この血液バッグを 37℃ で 24 時間、穏やかに攪拌しながらインキュベートした。この血液中の IL-10 誘導量を、

- 5 ENDOGEN 社製ヒト IL-10 測定キットを用いたこと以外実施例 1 と同様に測定した。結果を表 8 に示した。また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後において、血漿中の IL-10 の値は全て 15 pg/mL 以下であった。

（比較例 50）

- 10 BCG を物理吸着処理していない担体 1 を使用したこと以外は実施例 17 と同様にして IL-10 誘導量を測定した。結果を表 8 に示した。

表 8

	IL-10 (pg/mL)
実施例 17	362
比較例 50	<77

- 15 （実施例 18）

実施例 13 と同様に作製した BCG を粒子表面に物理吸着させた担体 1 をかさ体積で 0.1mL を 24 ウェルのマルチプレート（コーニング社製）に添加した。C3H/He マウス（8 週齢、雌、日本 SLC より購入）から脾臓細胞をできるだけ無菌的に採取し、500000 細胞/mL の濃度になるように RPMI 培地（2% 牛胎児血清含有）にて調製した。

- 20 この脾臓細胞懸濁液 1.5mL をマルチプレートの各ウェルに添加し、5% 炭酸ガス下で 37℃ で培養した。48 時間後、各ウェルから培養上清を回収し、培養上清中の IFN- $\gamma$  濃度を、マウス IFN- $\gamma$  測定キット（ENDOGEN 社製）にて測定した。結果を表 9 に示した。



(比較例 51)

実施例 13 と同様に作製した BCG を粒子表面に物理吸着させた担体 1 を使用しなかったこと以外は実施例 18 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 9 に示した。

5

表 9

	IFN- $\gamma$ 濃度 (ng/mL)
実施例 18	72.1
比較例 51	<0.15

#### 産業上の利用可能性

- 10 本発明のサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法は、サイトカイン誘導剤を用いて、水に不溶性の多孔性の材料からなる担体の共存下で実用レベル相当量のサイトカインを誘導できる画期的なものである。

- 15 サイトカイン誘導剤単剤よりもかなり高いレベルのサイトカイン量を誘導することができ、サイトカインが有効である種々の疾患の治療に好適に用いることができる。さらに、本発明のサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法では、体外で血液及び血液成分等と接触させてサイトカインを誘導するものであり、必要に応じて、サイトカイン誘導後に副作用を発現する可能性のあるサイトカイン誘導剤等を除去してから治療に用いることができる。

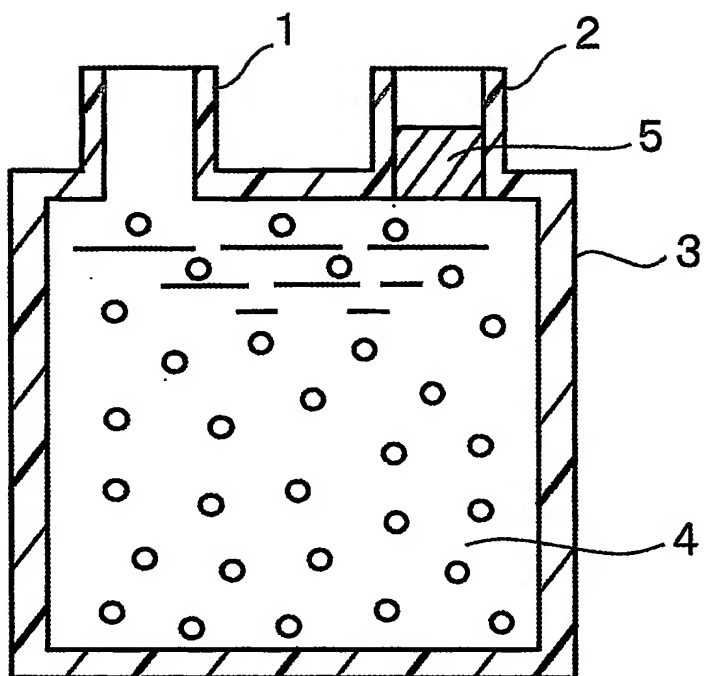
- 20 本発明により、サイトカイン誘導剤を投与する従来の方法よりも、副作用のほとんどない安全性の高い治療を達成することができる。このため、本発明のサイトカイン誘導用具及びサイトカイン誘導方法は、サイトカインの誘導が有効である様々な疾患の治療に好適に用いることができる。

## 請 求 の 範 囲

1. サイトカイン誘導剤と、水に不溶性の多孔性の材料の担体とを含むことを特徴とするサイトカイン誘導用具。
- 5 2. 前記多孔性の材料は、巨大網目構造を有する請求項1に記載のサイトカイン誘導用具。
3. 前記多孔性の材料は、細孔分布が2～2000Åであることを特徴とする請求項1または2に記載のサイトカイン誘導用具。
4. 前記多孔性の材料は、高分子材料からなる請求項1～3のいずれか1項に記載のサイトカイン誘導用具。
- 10 5. 前記高分子材料は、ポリスチレン系高分子材料及びアクリルエステル系高分子材料の少なくとも1種の高分子材料からなることを特徴とする請求項4に記載のサイトカイン誘導用具。
6. サイトカイン誘導剤は、菌体及び／または菌体由来成分であることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載のサイトカイン誘導用具。
- 15 7. サイトカイン誘導剤は、抗酸菌及び／または抗酸菌由来成分であることを特徴とする請求項6に記載のサイトカイン誘導用具。
8. サイトカイン誘導剤は、溶連菌及び／または溶連菌由来成分であることを特徴とする請求項6に記載のサイトカイン誘導用具。
- 20 9. 前記サイトカイン誘導剤及び前記多孔性の材料を収納している容器をさらに備える請求項1～8のいずれか1項に記載のサイトカイン誘導用具。
10. サイトカインを産生する細胞におけるサイトカインの産生を誘導するのに用いられる、請求項1～9のいずれか1項に記載のサイトカイン誘導用具。
- 25

- 1 1. . 前記サイトカインを産生する細胞が血液または血液成分由来の細胞である、請求項 1 0 に記載のサイトカイン誘導用具。
- 1 2. 前記多孔性の材料がサイトカイン誘導増強作用を有する請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載のサイトカイン誘導用具。
- 5 1 3. 請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載のサイトカイン誘導用具を用いることを特徴とするサイトカイン誘導方法。

図 1



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005986

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61K35/74, A61K47/32, A61K47/34, A61K47/38,  
A61K47/48, A61P19/02, A61P29/00, A61P37/02, A61P37/08,  
A61P35/00, A61P37/04, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61K35/74, A61K47/32, A61K47/34, A61K47/38,  
A61K47/48, A61P19/02, A61P29/00, A61P37/02, A61P37/08,  
A61P35/00, A61P37/04, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAP (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 03/37375 A1 (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.), 08 May, 2003 (08.05.03), Full text & JP 2003-201251 A	1-12
Y	JP 61-277628 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 08 December, 1986 (08.12.86), Full text; Claims; page 2, lower left column, 2nd line from the bottom to page 3, upper left column, 2nd line from the bottom; examples (Family: none)	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 July, 2004 (27.07.04)

Date of mailing of the international search report

17 August, 2004 (17.08.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005986

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 60-120821 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 28 June, 1985 (28.06.85), Full text & EP 147689 A2 & JP 60-252423 A & JP 61-85317 A & JP 61-87671 A & JP 61-93121 A & JP 61-93122 A & US 4839290 A	1-12
Y	WILKINSON, KA. et al., 'Enhancement of the human T cell response to culture filtrate fractions of Mycobacterium tuberculosis by microspheres.', J.Immunol.Methods, (2000), Vol.235, No.(1-2), pages 1 to 9	1-12
Y	JP 63-160578 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 04 July, 1988 (04.07.88), Full text; Claims; page 2, lower left column to page 4, lower left column (Family: none)	1-12
Y	JP 61-100522 A (Toray Industries, Inc.), 19 May, 1986 (19.05.86), Full text; Claims; page 2, lower left column to page 3, upper left column; examples (Family: none)	1-12
Y	JP 63-203623 A (Toray Industries, Inc.), 23 August, 1988 (23.08.88), Full text; Claims; page 2, lower right column to page 3, lower left column; examples (Family: none)	1-12
Y	Kazutoshi YAMAZAKI et al., 'Shushu no Kobunshi Oyobi Hyomen Arasa o Yusuru Zairyo ni Okeru Zen Kecchu no Karyukyu Kyuchaku Kyodo no Kento', Polymer Preprints, Japan, (1991), Vol.40, No.7, pages 2230 to 2232	1-12
Y	Kazuo NIIMURA et al., 'Somen Sakusan Cellulose Beads no Shuyo Eshi Inshi Yuki Sayo', The Japanese Journal of Artificial Organs, 1993, Vol.22, No.5, pages 1233 to 1237, full text, page 1234, left column, III.1., page 1235, left column, 2nd line from the bottom to page 1236, the last line	1-12
Y	JP 6-209992 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 02 August, 1994 (02.08.94), Full text; Claim 1; page 3, column 4, Par. No. [0016] to page 4, column 5, Par. No. [0027] (Family: none)	1-12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005986

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YASUHITO, A. et al., 'The endogenous induction of tumor necrosis factor serum (TNS) for adjuvant postoperative immunotherapy of cancer. -changes in immunological markers of the blood-', Japanese Journal of Surgery, 1990, Vol.20, No.1, pages 19 to 26	1-12
A	Akira HAYASHI, 'Gan Men'eki Ryoho no Atarashii Tenkai - Shoki Men'eki to Kakutoku Men'eki no Kakehashi to shite no BCG-CWS', Molecular Medicine, 1999, Vol.36, special extra issue, pages 220 to 229, full text, particularly, page 223, right column, line 5 to page 224, left column, line 1	1-12
A	Yoshiki RYOMA, 'Hitokuitekiki Koakusei Shuyozai Sonogo no Tenkai OK-432(Picibanil) Sonogo no Tenkai', Biotherapy, 2000, Vol.14, No.9, pages 877 to 885	1-12
A	FUJIMOTO, T. et al., 'Streptococcal preparation OK-432 is a potent inducer of IL-12 and a T helper cell 1 dominant state.', J.Immunol., 1997, Vol.158, No.12, pages 5619 to 5626	1-12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005986

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Even though the contents of the description are taken into consideration concerning the method of inducing a cytokine as set forth in claim 13, it cannot be understood that an embodiment of using an instrument for inducing a cytokine as set forth in any of claims (continued to extra sheet)
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005986

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

1 to 12, particularly *in vivo*, is clearly excluded therefrom. Therefore, it is recognized that this claim involves an embodiment relating to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

<Subject of search>

The invention according to claim 1 relates to an instrument for inducing a cytokine comprising, as the active ingredient, a compound defined by a desired property "a cytokine-inducing agent". Although claim 1 involves any compounds having this property, it appears that only small part of the claimed compounds are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5.

Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of the compounds with the property "a cytokine-inducing agent" cannot be specified. Thus, claim 1 does not comply with the requirement of clearness in the meaning within PCT Article 6 too.

Such being the case, the search was made mainly on prior arts with the use of BCG, OK-432 or other microbial cells and/or microbial cell components, which were employed in practice in the description of the present case, as "a cytokine-inducing agent" together with water-insoluble supports.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61K35/74, A61K47/32, A61K47/34, A61K47/38, A61K47/48, A61P19/02, A61P29/00, A61P37/02, A61P37/08, A61P35/00, A61P37/04, A61P43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61K35/74, A61K47/32, A61K47/34, A61K47/38, A61K47/48, A61P19/02, A61P29/00, A61P37/02, A61P37/08, A61P35/00, A61P37/04, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAP (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO 03/37375 A1 (SEKISUI CHEMICAL CO LTD) 2003.05.08 文献 全体 & JP 2003-201251 A	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.07.2004

国際調査報告の発送日

17.8.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保元浩

4 C

8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 61-277628 A (旭化成工業株式会社) 1986.12.08 文献全体、 特許請求の範囲、p.2左下欄下から第2行-p.3左上欄下から第2行、 実施例 (ファミリーなし)	1-12
Y	JP 60-120821 A (旭化成工業株式会社) 1985.06.28 文献全体 & EP 147689 A2 & JP 60-252423 A & JP 61-85317 A & J P 61-87671 A & JP 61-93121 A & JP 61-93122 A & US 4839 290 A	1-12
Y	WILKINSON, KA et al. 'Enhancement of the human T cell respon se to culture filtrate fractions of Mycobacterium tuberculos is by microspheres.' J. Immunol. Methods, (2000) vol.235 n o. (1-2) p.1-9	1-12
Y	JP 63-160578 A (旭化成工業株式会社) 1988.07.04 文献全体、 特許請求の範囲、p.2左下欄-p.4左下欄 (ファミリーなし)	1-12
Y	JP 61-100522 A (東レ株式会社) 1986.05.19 文献全体、特許請 求の範囲、p.2左下欄-p.3左上欄、実施例 (ファミリーなし)	1-12
Y	JP 63-203623 A (東レ株式会社) 1988.08.23 文献全体、特許請 求の範囲、p.2右下欄-p.3左下欄、実施例 (ファミリーなし)	1-12
Y	山崎和俊他 '種々の高分子および表面粗さを有する材料における 全血中のか粒球吸着挙動の検討' 高分子学会予稿集, (1991) vo l.40, no.7 p.2230-2232	1-12
Y	新村和夫他 '粗面酢酸セルロースビーズの腫瘍壊死因子誘起作用 ' 人工臓器, 1993, VOL.22, NO.5, p.1233-1237 文献全体、p. 1234左欄III.1.、p.1235左欄下から第2行-p.1236文献末尾	1-12
Y	JP 6-209992 A (積水化学工業株式会社) 1994.08.02 文献全体、 請求項1、第3頁第4欄【0016】-第4頁第5欄【0027】 (ファミリーなし)	1-12

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	YASUHITO, A. et al. 'The endogenous induction of tumor necrosis factor serum (TNS) for adjuvant postoperative immunotherapy of cancer. - changes in immunological markers of the blood -' Japanese Journal of Surgery, 1990, vol.20, no.1, p.19-26	1-12
A	林昭 '癌免疫療法の新しい展開 - 初期免疫と獲得免疫の架け橋としてのBCG-CWS' Molecular Medicine, 1999, vol.36, 臨時増刊号 p.220-229 文献全体、特にp.223右欄第5行-p.224左欄第1行	1-12
A	両馬良樹 '非特異的抗悪性腫瘍剤 その後の展開 OK-432 (ピシバニール) その後の展開' Biotherapy, 2000, vol.14, no.9, p.877-885	1-12
A	FUJIMOTO, T. et al. 'Streptococcal preparation OK-432 is a potent inducer of IL-12 and a T helper cell 1 dominant state.' J. Immunol., 1997, vol.158, no.12, p.5619-5626	1-12



<調査の範囲について>

請求項1に係る発明は、「サイトカイン誘導剤」という、所望の性質により定義された化合物を有効成分とするサイトカイン誘導用具に関するものである。そして、請求項1は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分に過ぎないものと認められる。

また、「サイトカイン誘導剤」については、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求項1は、PCT6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は主として、本願明細書中で具体的に採用されているBCGやOK-432、もしくはその他の菌体及び／又は菌体由来成分を「サイトカイン誘導剤」として採用し、かつ水に不溶性の担体を併せて適用してなる先行技術について行った。